Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce

IN-VIVO-GLUKOSEUMSATZ VON EHRLICH-MÄUSE-ASCITESTUMOREN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Krauser, Nora geb. Hanke
aus Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0089

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce

IN-VIVO-GLUKOSEUMSATZ VON EHRLICH-MÄUSE-ASCITESTUMOREN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Krauser, Nora geb. Hanke

aus Berlin

Referent: Professor Dr. E. Liss

Korreferent: Professor Dr. D. Neubert



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. 6. 1976

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	Stoffwechselverhältnisse in Tumorgewebe	1
1.2.	Angaben in der Literatur bezüglich der in-vivo-Glukosekonzentration bei Ascitestumoren	1
1.3.	Fragestellung der Arbeit	2
2.	Material und Methode	3
2.1.	Verwendete Zellen	3
2.2.	Inkubationsversuche	3
2.3.	Bestimmung von Glukose, Glukose-6-Phosphat und Laktat	3
2.3.1.	Glukosebestimmung	6
2.3.2.	Glukose-6-Phosphat-Bestimmung	7
2.3.3.	Bestimmung der tatsächlichen Glukose mit Hilfe der Hexokinasemethode	7
2.3.4.	Laktatbestimmung	8
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Glukosegehalt im Asciteskrebsserum	9
3.1.1.	Prüfung der in der Literatur vorgeschlagenen Methoden zur Art der Zellentnahme	9
3.1.1.1	Vorschläge in der Literatur	9
3.1.1.2	Prüfung der in der Literatur vorgeschlagenen Methoden	10
3.1.2.	Messung des Glukosespiegels im Asciteskrebsserum	15
3.1.2.1	Versuchsdurchführung	15
3.1.2.2	Ermittelte Werte	15
3.2.	Glukoseinflux	16
3.2.1.	Angaben in der Literatur	17
3.2.2.	Messung des Glukoseinflux	17
3.2.3.	Ermittelte Werte	17

Seite

3.3.	Inkubationsversuche mit niedrigen Glukosegaben	19
3.3.1.	Versuchsbedingungen	19
3.3.2.	Versuchsaufbau	20
3.3.3.	Ermittelte Werte	21
4.	Zusammenfassung und Diskussion	23

1. Einleitung

1.1. Stoffwechselverhältnisse in Tumorgewebe

Während normale Zellen ihre zum Leben notwendige Energie überwiegend durch Oxydationsprozesse gewinnen, steht bei Tumorzellen die anaerobe Glykolyse, verbunden mit dem Auftreten einer aeroben Glykolyse, im Vordergrund. Die Ursache hierfür sah WARBURG (1956) in einer Schädigung der Zellatmung, die zu einem Energiedefizit führt und durch Gärungsenergie ersetzt wird, wobei ein quantitativer Zusammenhang zwischen Tumorgärung und Tumorwachstum bestehen soll (WARBURG et al., 1956). Andere Autoren dagegen sehen die Bedeutung der Glykolyse von Krebszellen neben der Energiegewinnung vor allem in der Bildung von Stoffwechselzwischenprodukten, die dem Zellaufbau dienen sollen (EAGLE et al., 1958; GRAFF et al., 1965).

Unbestritten ist auf jeden Fall die hohe Glykolysekapazität vieler Arten von Tumorzellen. Inwieweit diese Kapazität in vivo auch ausgenützt wird, hängt in entscheidendem Maße von der Höhe des tatsächlichen Glukoseangebots ab. Der in-vivo-Glukosespiegel ist somit ein wichtiger Faktor für das Ausmaß der Glykolyse.

1.2. Angaben in der Literatur bezüglich der in-vivo-Glukosekonzentration bei Ascitestumoren

In der vorliegenden Literatur findet man keine einheitlichen Angaben über die bis jetzt gemessenen in-vivc-Glukosekonzentrationen, die Schwankungsbreite zwischen den verschiedenen Werten ist vielmehr außerordentlich hoch. WARBURG und HIEPLER fanden in ihren 1952 veröffentlichten Versuchen keine Glukose, ebenso KLEIN (1956). GOROZHANSKAYA und SHAPOT haben 1964 diese Angaben bestätigt. Sie konnten weder im Ascitesserum noch in den Karzinomzellen selbst Glukose nachweisen.

NAKAMURA und HOSODA (1968) gaben eine Glukosekonzentration im Asciteskrebsserum kleiner als 0,3 µg/ml an, der Nachweisgrenze ihrer Version der Glukose-Oxidase-Methode.

Im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten von BURGESS und SYLVEN, die 1962 den Glukosegehalt im Mäuseascites zu verschiedenen Zeiten nach Impfung mit Krebszellen gemessen haben. Sie ermittelten zwischen dem fünften und zehnten Tag nach Inokulation Glukosekonzentrationen in einem Bereich von 50 bis 100 µg/ml, zwölf Tage danach war der Glukosespiegel auf 30 µg/ml gesunken. Demgegenüber fand V. ARDENNE (1966) einen Glukosespiegel von 10 µg/ml in einem fünf Tage alten Ascitestumor und gab in derselben Arbeit die mittlere Glukosemenge eines Tumors mit 1/100 bis 1/20 der Blutglukose an. KEMP und MENDEL (1957) berichteten von einem gemessenen Glukosespiegel von 50 bis 70 µg/ml, auch WU (1965) bezog sich auf diesen Wert. Nach DEL MONTE und ROSSI (1963), die als Versuchstiere Ratten verwendeten, beträgt die mittlere Glukosemenge im Asciteskrebsserum 40 $\pm$ 6 µg/ml.

Sehr viel höhere Glukosekonzentrationen findet man dagegen in der Arbeit von CHRISTENSEN und RIGGS (1952), nämlich 250 bis 350 µg/ml.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Die dargestellten Angaben verdeutlichen die uneinheitlichen Beobachtungen zu diesem Problem in der Literatur. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Versuch unternommen werden, das tatsächliche Glukoseangebot im Asciteskrebsserum sowie die in vivo Glykolyserate zu bestimmen und eventuelle Ursachen für die dargestellten Widersprüche zu finden. Dazu wurden außer direkten Bestimmungen der Glukose im Ascites Glukoseinfluxmessungen sowie Inkubationsversuche mit niedrigen Glukosekonzentrationen durchgeführt.

2. Material und Methode

2.1. Verwendete Zellen

Ehrlich-Ascitestumorzellen wurden durch regelmäßige Transplantationen auf weiblichen CF 1 Mäusen gehalten und in der Regel sechs bis acht Tage nach der Implantation verwendet.

2.2. Inkubationsversuche

Die nach Tötung der Tiere gewonnenen Tumorzellen wurden in einem Inkubationsmedium aufgenommen, das sich aus 90 Teilen Ringerlösung, 25 Teilen isotonischem Tris-Puffer vom pH 7,4 und 5 Teilen isotonischem Phosphatpuffer vom pH 7,4 zusammensetzt. Die Bestimmung der Dichte der Zellsuspension erfolgte durch Abzentrifugieren in Hämatokritröhrchen. Im allgemeinen wurden die Suspensionen auf eine Konzentration von 10 µl Zellen/ml Inkubationsgemisch eingestellt.

Für einen Teil der Versuche fanden gewaschene Zellen Verwendung, d. h., daß die Zellen nach Abzentrifugieren bei 800 bis 1000 U/min erneut im Inkubationsmedium aufgenommen wurden. Die Ansätze erfolgten bei 37 °C im Schüttelthermostaten (Braun Melsungen). Zu bestimmten Zeiten entnommene Proben wurden mit eisgekühlter $HClO_4$ gemischt (Endkonzentration 0,5 N), bei 0 °C abzentrifugiert und der Überstand mit 9 N KOH neutralisiert (COE 1966).

2.3. Bestimmung von Glukose, Glukose-6-Phosphat und Laktat

Die in den Proben enthaltenen Konzentrationen an Glukose, Glukose-6-Phosphat und Laktat wurden fluorometrisch im kontinuierlichen Fließsystem mit einem Auto-Analyzer (Technicon) bestimmt.

Als Grundlage für die Zusammenstellung des Systems (Abb. 1) dienten die Angaben von LEESE und BRONK (1972). Die zu untersuchenden Lösungen wurden mit den entsprechenden Enzymen und Substraten (Firma Boehringer Mannheim) gemischt, in einem Wasserbad von 37 °C erwärmt und einem Turner-Fluorometer zugeführt. Dort wurde das Reaktionsgemisch in einer Quarz-Durchflußküvette von Licht der Wellenlänge 360 nm (Primärfilter) angeregt, die Intensität der entstehenden Fluoreszenzstrahlung nach Durchgang durch ein Sekundärfilter von > 450 nm gemessen und von einem angeschlossenen Schreiber registriert.

Bei allen Meßreihen wurde vorher eine Eichkurve aufgenommen sowie im Abstand von zehn Proben jeweils ein Eichwert zur Kontrolle mitgemessen. Für die Bestimmung aller 3 Substanzen konnte der gleiche Versuchsaufbau verwendet werden.

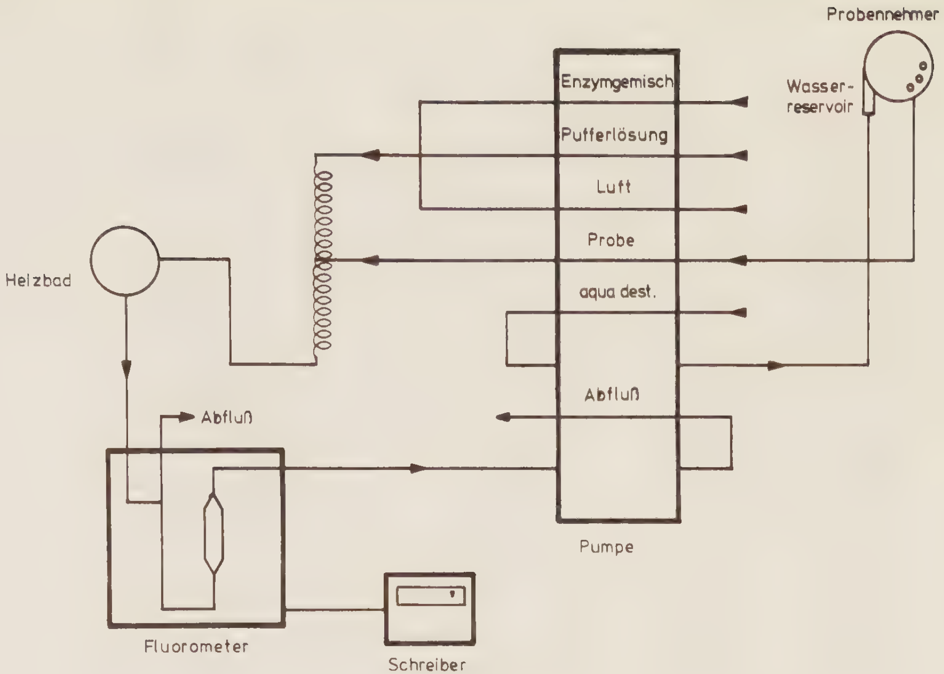
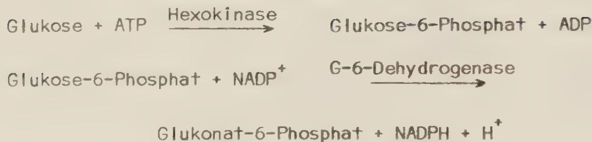


Abb. 1 Automatisches Fließsystem zur Bestimmung von Glukose, Glukose-6-Phosphat und Laktat nach LEESE und BRONK (1972)

2.3.1. Glukosebestimmung

Prinzip:



Glukose + ATP $\xrightarrow{\text{Hexokinase}}$ Glukose-6-Phosphat + ADP

Glukose-6-Phosphat + $NADP^+$ $\xrightarrow{\text{G-6-Dehydrogenase}}$

Glukonat-6-Phosphat + NADPH + H^+

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

1. Puffer/NADP/ATP-Lösung: 120 ml 10^{-1} M Tris-Puffer pH 8.0, 24 ml 10^{-1} M $MgCl_2$-Lösung, 12 ml 0,01 % Serumalbuminlösung, 1,5 ml 3 x 10^{-3} M NADP-Lösung und 0,75 ml 10^{-2} M ATP-Lösung auf 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

2. Enzymgemisch: 0,075 mg G-6-P-Dehydrogenase und 0,3 mg Hexokinase in 18 ml Aqua dest.

Das bei der Reaktion gebildete und fluorometrisch gemessene NADPH ist ein Maß für die in den Proben enthaltenen Glukosemengen. Mit Hilfe dieser Methode ließen sich Glukosekonzentrationen bis in einen Bereich von 0,5 bis 1 µg/ml nachweisen. Das in den neutralisierten Proben noch enthaltene $KClO_4$ störte die Bestimmung nicht, wie Wiederfindungsversuche zeigten.

2.3.2. Glukose-6-Phosphat-Bestimmung

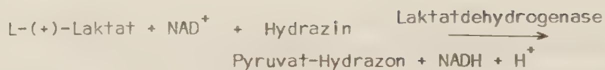
Analog zur Bestimmung der Glukose kann mit der angegebenen Methode auch das Glukose-6-Phosphat ermittelt werden. Unter Fortlassen des Enzyms Hexokinase wird der erste Reaktionsschritt der oben beschriebenen Gleichung ausgeschaltet, so daß das gebildete NADPH nur dem in der Probe enthaltenen Glukose-6-Phosphat entspricht.

2.3.3. Bestimmung der tatsächlichen Glukose mit Hilfe der Hexokinasemethode

Bei der Bestimmung der Glukose mit Hilfe der Hexokinasemethode wird zwangsläufig das in den Proben enthaltene Glukose-6-Phosphat mitgemessen. Eine getrennte Erfassung der Glukose ist möglich, indem die Analysen parallel mit und ohne Hexokinasezusatz durchgeführt und die erhaltenen Werte voneinander subtrahiert werden. Bei Anwesenheit sehr kleiner Glukosemenger und großer Mengen an Glukose-6-Phosphat -wie es zum Beispiel bei Extrakten frisch entnommener Ascitestumoren der Fall ist- versagt diese Methode. In diesen Fällen wurden vor der Analysendurchführung die Extrakte über eine DEAE-Sephadex-Säule (Sephadex Anionenaustauscher A 25) gegeben. Dadurch kam es zu einer selektiven Bindung von Glukose-6-Phosphat, das bei der folgenden Glukosebestimmung im Eluat mit Hilfe der Hexokinasemethode nicht mehr störte.

2.3.4. Laktatbestimmung

Prinzip:



$$\text{L-(+)-Laktat} + NAD^{+} + \text{Hydrazin} \xrightarrow{\text{Laktatdehydrogenase}} \text{Pyruvat-Hydrazon} + NADH + H^{+}$$

Folgende Lösungen wurden verwendet:

1. Puffer/NAD-Lösung: 10 mg Glycin, 7 mg Hydrazinsulfat, 0,27 mg AEDTA, 0,1 mg NAD und 67 ml 2 N NaOH auf 250 ml mit Aqua dest. aufgefüllt

2. Enzymgemisch: 1,25 mg Laktatdehydrogenase in 20 ml Aqua dest.

Das bei der Reaktion gebildete NADH wurde fluorometrisch gemessen. Seine Menge entspricht dem in den Proben enthaltenen Laktat.

3. Ergebnisse

3.1. Glukosegehalt im Asciteskrebsserum

3.1.1. Prüfung der in der Literatur vorgeschlagenen Methoden zur Art der Zellentnahme

3.1.1.1 Vorschläge in der Literatur

Die unterschiedlichen Angaben in der Literatur über die Höhe der gemessenen Glukosespiegel im Asciteskrebsserum können nur zu einem geringen Teil durch ein verschiedenartiges Verhalten der Tumorzellen erklärt werden. Somit kommt der Versuchsanordnung und der Technik der Versuchsdurchführung eine entscheidende Bedeutung zu.

Die erste Schwierigkeit ergab sich bei der Art der Zellentnahme. Da eine vom Körper angebotene relativ geringe Glukosemenge einer hohen Glykolysekapazität gegenübersteht, wird der effektive Glukosespiegel im Ascites sehr niedrig sein. Dies führen auch einige Autoren zur Erklärung der Tatsache an, daß sie in der Asciteszellsuspension keine Glukose gefunden haben (GOROZHANSKAYA und SHAPOT 1964; NAKAMURA und HOSODA 1968; SHAPOT 1972; WARBURG und HIEPLER 1952).
Es bestand daher die Notwendigkeit, die Ascitesflüssigkeit aus der Bauchhöhle so schnell wie möglich zu entnehmen und die Enzymsysteme in den Zellen sofort zu zerstören oder die Zellen umgehend von der Ascitesflüssigkeit zu trennen, um einen Verbrauch der möglicherweise vorhandenen Glukose während der Entnahme zu vermeiden.

Die zu diesem Problem in der Literatur unterbreiteten Vorschläge bzw. dargestellten Versuchsbedingungen sind sehr unterschiedlich; oft werden auch keine Angaben gemacht. WARBURG und HIEPLER (1952) kühlten den entnommenen Ascites auf 0 °C ab, ebenso NAKAMURA und HOSODA (1968), die die Asciteskrebssuspension zur Glukosebestimmung 5 Minuten lang bei 0 °C zentrifugierten. KEMP und MENDEL (1957) hemmten die Enzymsysteme mit Äthanol, GOROZHANSKAYA und SHAPOT (1964) benutzten dazu eine 0,02 M NaF-Lösung. Im folgenden soll durch eine Reihe von Versuchen gezeigt werden, daß ein großer Teil der dargestellten Verfahren untauglich ist.

3.1.1.2 Prüfung der in der Literatur vorgeschlagenen Methoden

Um zu ermitteln, inwieweit die Glykolyse durch Abkühlen auf 0 °C gehemmt wird, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: Nach Entnahme der Ehrlich Ascitestumoren aus der Bauchhöhle erfolgte die Einstellung der Suspension mit Ringer-Tris-Puffer auf die gewünschte Zellkonzentration. Die Zellsuspension und eine Glukoselösung wurden 15 Minuten lang bei 0 °C im Eisbad vorgekühlt und anschließend gemischt. Zell- und Glukosekonzentrationen waren so gewählt, daß sich im Endvolumen von 2 ml 100 µl Zellen und 100 µg Glukose befanden. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und darin der Glukosegehalt bestimmt. Da unter diesen Bedingungen die eingesetzte Glukose schon nach 10 Minuten verbraucht war (Abb. 2), wurde der Versuch mit der doppelten Menge an Glukose wiederholt (Abb. 3).

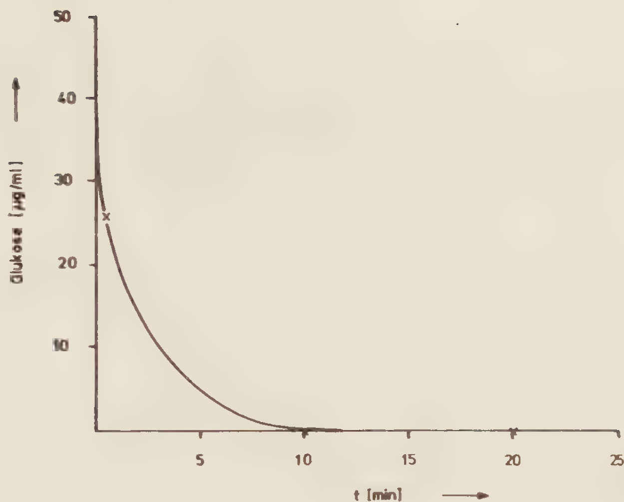


Abb. 2 Glukoseverbrauch von Ascitestumoren bei 0 °C
(Anfangsglukosekonzentration 50 µg/ml)

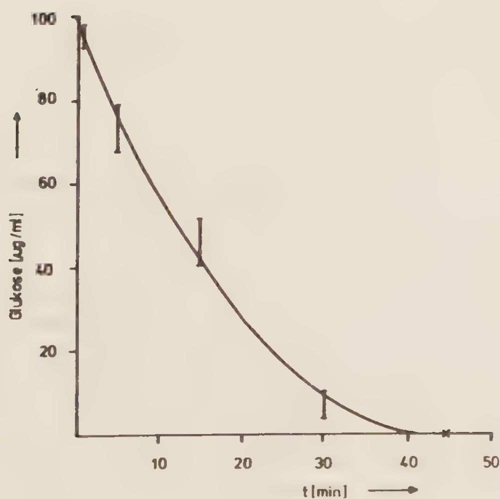


Abb. 3 Glukoseverbrauch von Ascitestumoren bei 0 °C
(Anfangsglukosekonzentration 100 µg/ml)

Aus den Messungen zwischen 0 und 15 Minuten ergab sich ein Glukoseverbrauch von 215 µg Glukose / Std. / 50 µl Zellen bei 0 °C. Dies entspricht etwa 25 % des Glukoseverbrauchs bei 37 °C, wie er sich unter Annahme eines Q_{Laktat}^{aerob} von 25 µl "CO_2" / Std. / mg $\text{Zellen}_{(trocken)}$ errechnen läßt.
Daraus folgt, daß bei 0 °C die Glykolyserate zwar vermindert ist, die niedrige Temperatur aber nicht zu einem völligen Sistieren der Gärung führt. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von V. ARDENNE und REITNAUER (1966, Abb. 4), wonach bei 0 °C praktisch keine Glykolyseaktivität mehr nachgewiesen worden ist. Zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Ascitesserum des lebenden Tieres erscheint das Abkühlen der Zellsuspension daher ungeeignet. Die durchgeführten Versuche liefern gleichzeitig eine Erklärung dafür, daß verschiedene Autoren keine Glukose nachweisen konnten (NAKAMURA und HOSODA 1968; WARBURG und HIEPLER 1952).

Ein weiterer Vorschlag in der Literatur zur Hemmung der Glykolyse ist die Anwendung von Natriumfluorid. GOROZHANSKAYA und SHAPOT (1964) mischten ihre entnommenen Ascitestumoren mit einer 0,02 M NaF-Lösung und bestimmten anschließend die darin enthaltene Glukose.

Um die Wirksamkeit von NaF auf die Glykolysehemmung zu ermitteln, wurde folgender Versuch durchgeführt:

2 Parallelansätze mit 100 µl Zellen und 100 µg Glukose in 10 ml Medium wurden 9 Minuten lang inkubiert. Nach 3 Minuten erfolgte zu einem der Inkubationsgemische die Zugabe von 25 mg NaF, der Glukoseabbau des anderen Ansatzes verlief ungestört weiter.
Der Einfluß von NaF auf die Glykolyserate wurde in Abb. 4 dargestellt.

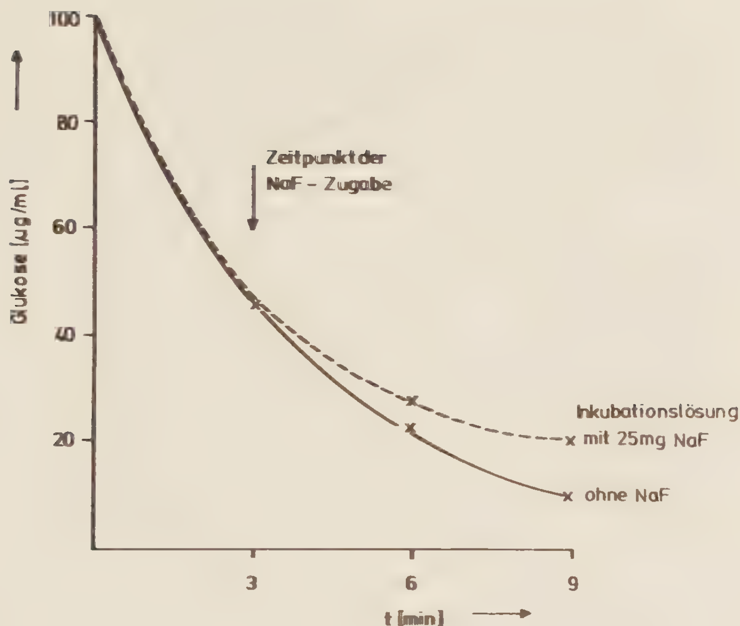


Abb. 4 Glykolysehemmung durch NaF

Daraus wird ersichtlich, daß es durch NaF zwar zu einer leichten Hemmung des Glukoseabbaus kommt, der Glukoseverbrauch aber immer noch erheblich ist, obwohl sogar die dreifache Menge der vom GOROZHANSKAYA und SHAPOT (1964) angegebenen NaF-Konzentration verwendet wurde. Zur Fixierung des in-vivo vorliegenden Glukosegehalts erscheint diese Methode daher ungeeignet, zumal im dem Ascitestumoren noch niedrigere Glukosekonzentrationen vorliegen werden als in dem besprochenen Versuch.

Ein ähnliches Resultat ergeben Versuche, die Glykolyse durch Monojodacetat zu hemmen. Zu einem Ansatz von 10 ml mit 25 µl Zellen/ml und 25 µg Glukose/ml wurden sofort nach Mischung 300 µg bzw. 600 µg MJA hinzugefügt. Auch hier kommt es, besonders in der Anfangsphase, noch zu einem erheblichen Glukoseverbrauch (Abb. 5).

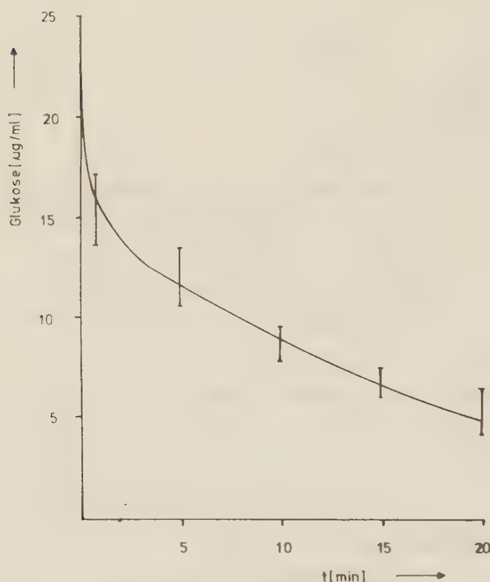


Abb. 5 Hemmung der Glykolyse durch MJA

Es erscheinen alle der bis jetzt dargestellten Methoden zur Glykolysehemmung ungeeignet, so daß es unmöglich ist, unter Aufrechterhaltung der vorhandenen Glukosekonzentration Zellen vom Serum abzutrennen.

Eine sofortige Hemmung der Glykolyse kann nur durch sehr schnelle Säurezugabe (TCE oder $HClO_4$) zur Asciteszellsuspension erreicht werden. Die mit der Zerstörung der Zellen auftretenden Schwierigkeiten (3.1.2.) müssen dabei in Kauf genommen werden.

3.1.2. Messung des Glukosespiegels im Ascitesserum

3.1.2.1 Versuchsdurchführung

Zur Zellentnahme wurden die Tiere mit Äther anästhesiert und die Asciteszellsuspension mit Hilfe einer Punktionskanüle entnommen. Innerhalb von 2 bis 3 Sekunden wurden die so gewonnenen Proben mit eisgekühlter 5 N $HClO_4$ vermischt.
Um die genaue Menge der entnommenen Ascitesflüssigkeit bestimmen zu können, wurden die mit $HClO_4$ gefüllten Zentrifugengläser vor und nach Probenzugabe gewogen. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 0 ^{o}C wurde der Überstand abgegossen, mit 9 N KOH neutralisiert und darin die Glukose bestimmt.

3.1.2.2 Ermittelte Werte

Problematisch an der nachfolgenden Glukosebestimmung war die Tatsache, daß in den durch Säurefällung erhaltenen Extrakten nicht nur die Bestandteile des Ascitesserums, sondern auch die säurelöslichen Zellbestandteile, wie z. B. Glukose-6-Phosphat, enthalten waren. Wie schon unter 2.3.3. dargestellt, ist eine getrennte Erfassung der Glukose möglich, indem man die Analysen parallel mit und ohne Hexokinasezusatz durchführt. Wie entsprechende Versuche jedoch ergaben, beträgt unter den gewählten Bedingungen der Gehalt der Extrakte an Glukose weniger als 10 % der Summe von Glukose und Glukose-6-Phosphat.

Wegen der Streubreite der Analysen ist eine zuverlässige Bestimmung des Glukosegehaltes durch Berechnung der Differenz nicht möglich. Es wurde daher das Glukose-6-Phosphat zunächst durch selektive Bindung an einen Anionenaustauscher abgetrennt und dann die Glukose wie unter 2.3.1. angegeben bestimmt.

Die bei 160 durchgeführten Messungen gewonnenen Ergebnisse zeigten eine ungewöhnlich hohe Streubreite. Die statistische Untersuchung der Werte ergab keine Normalverteilung. Das Hauptfeld der Ergebnisse lag in einem Bereich zwischen 0,5 µg/ml und 4,0 µg/ml. Die Angabe eines arithmetischen Mittelwertes und seiner Streubreite erscheint unter diesen Umständen nicht gerechtfertigt, stattdessen wurde als Medianwert der Betrag von 1,15 µg/ml ermittelt. Zweifellos müßte in weiteren Versuchen geklärt werden, worin die Ursachen für das Auftreten der ungewöhnlich hohen Streuungen zu suchen sind.

3.2. Glukoseinflux

Die vorangegangenen Versuche zeigten, daß die Ermittlung der in-vivo-Glukosekonzentration schwierig war und große Streubreiten beobachtet wurden. Bei der Suche nach weiteren Möglichkeiten, Aufschluß über die Glukoseversorgung von Ascitestumoren zu erhalten, bot sich die Messung der Geschwindigkeit an, mit der Glukose in die Bauchhöhle einströmt, da dieser Influx zweifellos einen limitierenden Faktor für den Glukoseverbrauch darstellt.

3.2.1. Angaben in der Literatur

Influxmessungen haben schon früher DEL MONTE und ROSSI (1963) sowie KEMP und MENDEL (1957) durchgeführt.
DEL MONTE und ROSSI benutzten als Versuchstiere Ratten (normale und tumortragende Tiere), injizierten ihnen 50 ml zellfreies Ascitesserum in die Peritonealhöhle und maßen über eineinhalb Stunden die Blutglukose und den Anstieg der Glukosekonzentration im Ascites. Aus ihren Messungen errechneten sie einen Glukoseeinstrom von 25 mg Glukose / Std. / 50 ml Ascitesflüssigkeit (DEL MONTE und ROSSI 1963, Chart 1).

KEMP und MENDEL (1957) injizierten 5 ml einer Ascitesflüssigkeit mit 3 mg Glukose / 100 ml in den Bauchraum von Mäusen und entnahmen Proben nach drei Minuten. Der Glukosegehalt war auf 17 mg / 100 ml angestiegen. Daraus errechnet sich ein Glukoseeinstrom von 14 mg Glukose / Std. in 5 ml Ascites.

3.2.2. Messung des Glukoseinflux

Als Versuchstiere dienten gesunde Mäuse ohne Ascitestumor. Pro Tier wurden 2 ml eines durch Erwärmen auf 56 °C inaktivierten Ascitesserums in die Bauchhöhle injiziert, ein Volumen, das einem 6 bis 8 Tage alten Mäuseascitestumor entspricht. Aus den anästhesierten Tieren wurden zu verschiedenen Zeiten Proben der Ascitesflüssigkeit entnommen und die darin enthaltene Glukose bestimmt.

3.2.3. Ermittelte Werte

Die Ergebnisse sind dargestellt in Abb. 6. Bei allen durchgeführten Messungen kam es zu einem sehr schnellen Glukoseeinstrom innerhalb der ersten Minute, dem ein kontinuierlicher, langsamerer Einstrom folgte.

Eine Erklärung für diesen zweiphasigen Verlauf wurde in dem sich ändernden Konzentrationsgefälle vermutet. Diese Annahme konnte aber dadurch widerlegt werden, daß es auch dann zu einem besonders schnellen Glukoseeinstrom in der ersten Minute kam, wenn schon glukosehaltiges Serum in den Bauchraum gespritzt wurde. Der weitere Glukoseeinstrom erfolgte linear, wie es in der Abb. 6 dargestellt worden ist.

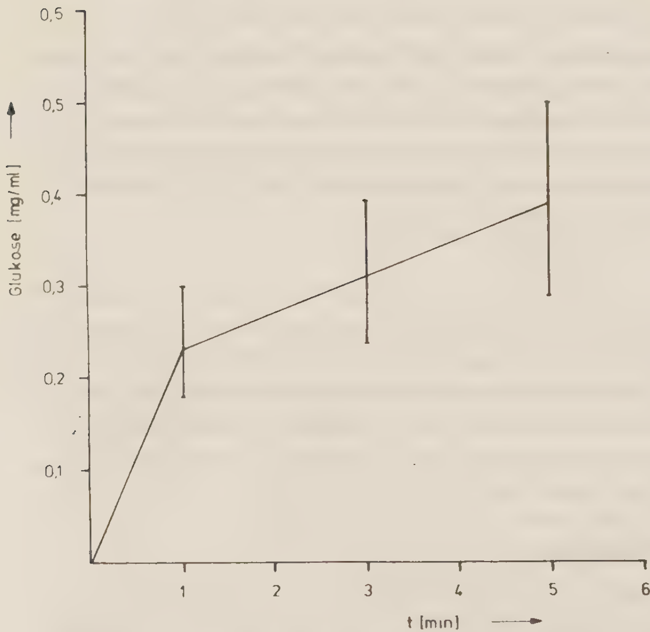


Abb. 6 Glukoseeinstrom in Ascitesserum lebender Tiere

Nach den Ergebnissen dieser Versuche strömen innerhalb von 4 Minuten 0,16 mg/ml Glukose ein, das bedeutet 4,8 mg Glukose/Std. bei einem durchschnittlichen Ascitestumor von 2 ml. Bei einer Zellkonzentration von etwa 300 mg Zellen/ml würde dieses Glukoseangebot zu einer Laktatbildung entsprechend einem Q-Wert von 9,9 µl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$ ausreichen. Dies allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die gesamte Glukose auch in Laktat umgesetzt wird, was sicher nicht der Fall ist. Die tatsächliche Laktatbildung wird demnach unter Q_{Laktat} 9,9 µl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$ liegen.

3.3. Inkubationsversuche mit niedrigen Glukosegaben

Im folgenden soll durch in-vitro-Versuche gezeigt werden, wie sich Tumorzellen hinsichtlich des Glukoseverbrauchs und der Laktatbildung verhalten, wenn durch geeignete Methoden eine sehr niedrige Glukosekonzentration kontinuierlich aufrecht erhalten wird.

3.3.1. Versuchsbedingungen

Bei den durchzuführenden Messungen galt es folgende Anforderungen zu erfüllen:

1. Kontinuierliche Glukoseversorgung einer Asciteskrebszellsuspension entsprechend den unter 3.2.3. ermittelten Werten.
2. Konstanthalten eines niedrigen Glukosespiegels über einen Versuchszeitraum von mindestens 30 Minuten.
3. Geringhalten von Veränderungen im Medium durch Stoffwechselvorgänge und Versuchsdurchführung.

Eine genaue, kontinuierliche Substratzugabe ist wichtig zur Simulation des In-vivo-Glukoseeinstroms. Dabei soll das jeweils zugeführte Volumen möglichst gering sein, um eine wesentliche Änderung des Gesamtvolumens zu vermeiden. Durchgeführte Messungen mit verschiedenen Schlauchpumpensystemen und anderen Dosiereinrichtungen -ähnlich der in der Arbeit von V. ARDENNE (1967) beschriebenen Apparatur- ergaben zu große Volumenschwankungen bei kontinuierlich zugeführter Substratzufuhr, so daß eine diskontinuierliche Substratzuführung vorgezogen wurde. Um zu starke Veränderungen im Inkubationsmedium durch Stoffwechselprodukte zu verhindern, wurde mit einem relativ geringen Krebszellanteil bei einem großen Gesamtvolumen gearbeitet.

3.3.2. Versuchsaufbau

Die Inkubationen erfolgten zumeist parallel mit zwei Versuchen, wobei die Ansätze jeweils 60 ml mit 10 µl Zellen / ml in 250 ml Erlenmeyerkolben betrugen. Diese Suspensionen wurden zehn Minuten lang bei 37 °C vorinkubiert. Um die in der Zwischenzeit entstandene Verarmung der Zellen an Glukose auszugleichen, wurden zu Beginn der Hauptphase der Inkubationen pro Ansatz eine Startmenge von 660 µg Glukose zugegeben, eine Menge, die in Vorversuchen als geeignet ermittelt worden war. Danach erfolgte in einem Zeitintervall von 30 Sek. eine für jede der sechs Versuchsreihen gleichbleibende Glukosezugabe. Die jeweiligen Glukosemengen betrugen 20, 25, 30, 40, 50, 60 µg / 50 ml. Zur Bestimmung von Glukose, Glukose-6-Phosphat und Laktat wurden Proben vor Versuchsbeginn, sofort nach Gabe der Startglukose und dann fortlaufend alle drei Minuten entnommen (Abb. 7).

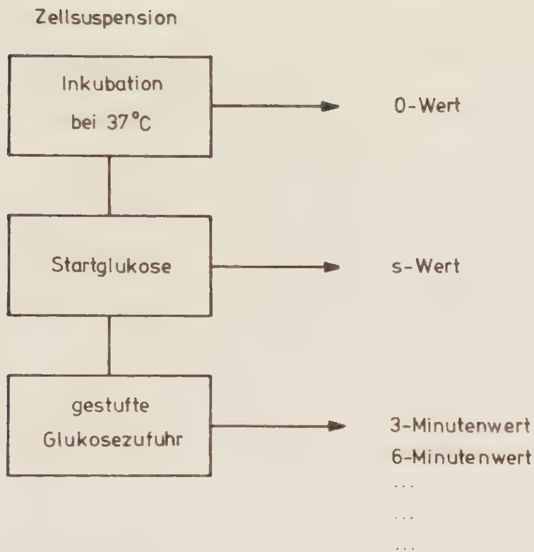


Abb. 7 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Inkubationsversuche

3.3.3. Ermittelte Werte

Die über 30 Minuten konstant gehaltenen Glukosespiegel lagen in einem Bereich zwischen 0,5 und 3 µg Glukose / ml Asciteszellsuspension bei zugeführten Glukosemengen von 20 bis 60 µg Glukose alle 30 Sekunden / 600 µl Zellen (Tabelle 1).

Fortlaufende Glukosezugabe (zu 60 ml Zellsuspension) µg / 30 Sek. über 30 Min.	Glukosespiegel µg/ml	Glukoseverbrauch mg/Std./600 mg Zellen	Laktatbildung mg/Std./600 mg Zellen
20	0,5	3,7	0,85 - 1,1
25	0,5 - 0,8	4,3	0,96
30	0,8 - 1,2	4,9	1,3
40	1,0 - 2,0	6,0	2,0 - 2,5
50	2,0 - 2,5	7,1	3,0
60	2,0 - 3,0	8,3	3,5

Tabelle 1 Glukoseverbrauch und Laktatbildung von Ascitestumoren bei niedriger Glukosezufuhr
- in-vitro-Versuche

Bei Steigerung der Glukosezufuhr über die genannten Werte hinaus konnte ein gleichbleibender Glukosespiegel während der Versuchsdauer in vitro nicht mehr aufrechterhalten werden, das bedeutet, daß es nicht mehr zu einem Ausgleich zwischen Glukosezufuhr und Verbrauch kam. Das gebildete Laktat für die Versuche in dem oben angegebenen Bereich lag zwischen 0,85 und 3,5 mg Laktat / Std. / 600 µl Zellen.

Errechnet man für die zugeführten Glukosemengen einschließlich der Startglukose und abzüglich der am Ende vorliegenden Glukosespiegel die möglichen Q-Werte bei vollständiger Umsetzung der Glukose über die Glykolyse, so liegen diese Werte zwischen Q_{Laktat} 7,6 und 16,5 µl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$.

Das tatsächlich gebildete Laktat entspricht dagegen nur einem Q_{Laktat} von 2,2 bis 7,2 µl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$.

Das bedeutet, daß bei niedrigem Glukoseangebot -wie es den in-vivo-Bedingungen nahe kommt- weniger als die Hälfte der angebotenen Glukose durch die Ascitestumoren über die Glykolyse abgebaut wird.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll weiteren Aufschluß über die Bedeutung der Glukose für Ascitestumoren geben.
Die zunächst durchgeführten Bestimmungen des in-vivo-Glukosespiegels im Ascites weißer Mäuse ergaben nach mehr als 150 Messungen einen Medianwert von 1,15 µg/ml.

Dieser Wert steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Autoren, die keine Glukose nachweisen konnten (GOROZHANSKAYA und SHAPOT 1964; KLEIN 1956; NAKAMURA und HOSODA 1968; WARBURG und HIEPLER 1952). Eine Erklärung für die Tatsache, daß diese Autoren keine Glukose nachgewiesen haben, muß im methodischen Vorgehen bei der Gewinnung der Ascitesflüssigkeit gesehen werden, wie unter 3.1.1. ausführlich dargestellt worden ist.

Daß andererseits in manchen Veröffentlichungen außerordentlich hohe Konzentrationen (bis 350 µg Glukose / ml Ascitesflüssigkeit) angegeben worden sind, muß auf der Anwendung unspezifischer Bestimmungsmethoden beruhen. Allerdings trat auch bei den hier vorgelegten Versuchen eine hohe biologische Streubreite auf, und für die Beobachtung, daß bei mehreren Tieren mehr als 30 µg/ml Glukose gefunden wurde, gibt es zunächst keine Erklärung. Eine definierte Aussage über die Höhe der Glukoseversorgung von Ascitestumoren durch alleinige Messung des in-vivo-Glukosespiegels erscheint deshalb sehr schwierig.

Genaueren Aufschluß über die Glukoseversorgung geben dagegen die durchgeführten Influxmessungen. Der immer wieder gemessene biphasische Verlauf -d. h. ein schneller Glukoseeinstrom, gefolgt von einem kontinuierlichen langsamen Zustrom- mag durch im Bauchraum vorhandene "schnell verfügbare" Glukose bedingt sein.

Bei der Berechnung des Glukoseeinstroms im 'steady state' ist die schnelle Phase unberücksichtigt gelassen worden, da sie für die in-vivo-Situation sicherlich keine Bedeutung hat. Der kontinuierliche Glukoseeinstrom liegt bei 4,8 mg Glukose / Std. / 2 ml Ascitesflüssigkeit.

Die gemessenen Werte liegen niedriger als die Ergebnisse von KEMP und MENDEL (1957), die bei ihren Messungen den biphasischen Verlauf des Glukoseeinstroms offenbar nicht erkannt haben und somit nicht berücksichtigen konnten. Würde man nur die ersten drei Minuten des Glukoseeinstroms betrachten, so erhielte man Influxwerte von 12 mg Glukose / Std. / 2 ml Ascites, diese Werte kommen den von KEMP und MENDEL gemessenen sehr nahe.

Die Ergebnisse von DEL MONTE und ROSSI (1963) können durch die Verschiedenartigkeit der Versuchsbedingungen -verwendete Tierart, unterschiedliche Serummengen- zum Vergleich nicht herangezogen werden.
Aus den unter 3.2.3. ermittelten Werten errechnet sich unter Annahme eines völligen Abbaus der Glukose über die Glykolyse ein möglicher Q_{Laktat} von 9,9 µl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$.
Nach Ermittlung des Glukoseangebots der Ascitestumoren sollten die anschließend durchgeführten in-vitro-Inkubationsversuche Aufschluß über die tatsächliche Glykolyserate geben. Die bei diesen Versuchen auftretenden Glukosekonzentrationen lagen alle um den unter 3.1.2.2 ermittelten Medianwert, wenn Glukose in einer Menge von 20 bis 60 µg/30 Sek. zugeführt wurde. Eine fortlaufende Glukosezufuhr von 40 µg Glukose / 30 Sek. / 600 µl Zellen entspricht etwa dem durch die Influxmessungen ermittelten Glukoseangebot.

Dem bei völligem Abbau durch die Glykolyse möglichen Q_{Laktat} von etwa 10 μl CO_2 / Std. / mg $Zellen_{(trocken)}$ steht aber eine durch die in-vitro-Versuche ermittelte tatsächliche Laktatbildung von Q_{Laktat} 5 gegenüber. Dies bedeutet, daß nur die Hälfte der den Asciteszellen angebotene Glukose über die Glykolyse zum Laktat abgebaut wird.

Zusammenfassend kann bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse folgendes gesagt werden:
Die Ascitestumoren müssen mit einem relativ niedrigen Glukoseangebot leben, das es ihnen nicht ermöglicht, ihre maximale Glykolysekapazität auszunützen. Die angebotene Glukose würde bei vollständigem Umsatz zum Laktat eine Glykolyserate ermöglichen, die 40 % der aeroben Glykolysekapazität entspricht. Die Höhe der tatsächlichen Glykolyserate bei dem ermittelten Glukoseangebot liegt dagegen nur bei 20 % der Glykolysekapazität. So wird nur die Hälfte der angebotenen Glukose über die Glykolyse zum Laktat abgebaut. Der restliche Teil wird entweder über den Citratzyklus abgebaut, oder er findet für die Biosynthese wichtiger Zellbestandteile Verwendung (Pentose-Phosphat-Zyklus, Nukleotidbildung).

Literaturverzeichnis

ARDENNE, M. v., ELSNER, J., KRÜGER, W., REITNAUER, P.G., RIEGER, F.: Zur Höhe und Bedeutung des effektiven Glukosespiegels in Tumoren. Ein Beitrag zur Theorie der Krebskrankheit. Klin. Wschr. 44, 503 (1966).

ARDENNE, M. v., REITNAUER, P.G.: Zur Abhängigkeit des Glukoseverbrauches von Ehrlich-Mäuse-Ascites-Krebszellen in-vitro von Temperatur und Hyperthermie-Vorbehandlung. Z. Naturforschg. 21 b, 841 (1966).

ARDENNE, M. v., KRÜGER, W., RIEGER, F.: Über die in-vitro-Simulation der in-vivo-Bedingungen beim Kohlenhydratstoffwechsel der Krebszellen. Archiv Geschwulstforschg. 29, 36 (1967).

BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim (Bergstr.) (1970).

BURGESS, E.A., SYLVÉN, B.: Glucose, Lactate, and Lactic Dehydrogenase Activity in Normal Interstitial Fluid and That of Solid Mouse Tumors. Cancer Res. 22, 581 (1962).

BURGESS, E.A., SYLVÉN, B.: Changes in Glucose and Lactate Content of Ascites Fluid and Blood Plasma During Growth and Decay of the Eld Ascites Tumor. Brit. J. Cancer 16, 298 (1962).

CHRISTENSEN, H.N., RIGGS, T.R.: Concentrative Uptake of Amino Acids by the Ehrlich Mouse Ascites Carcinoma Cells J. Biol. Chem. 194, 57 (1952).

COE, E.L.: Correlations between Adenine Nucleotide Levels and the Velocities of Rate-Determining Steps in the Glycolysis and Respiration of Intact Ehrlich Ascites Carcinoma Cells Biochim. Biophys. Acta 118, 495 (1966).

EAGLE, H., BARBAN, S., LEVY, M., SCHULZE, H.O.: The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures. J. Biol. Chem. 233, 551 (1958).

GOROZHANSKAYA, E.G., SHAPOT, V.S.: Characteristics of Glucose Consumption by Cancer Cells in Vivo. Dokl. Adad. Nauk. SSSR 155, 947 (1964).

GRAFF, S., MOSER, H., KASTNER, O., GRAFF, H.M., TANNENBAUM, M.: The Significance of Glycolysis. J. Nat. Cancer Inst. 34, 511 (1965).

KEMP, A., MENDEL, B.: How Does the Ehrlich Ascites Tumor Obtain its Energy for Growth. Nature, 180, 131 (1957).

KLEIN, G.: Some Recent Studies on the Production and Growth Characteristics of Ascites Tumors. Z. Krebsforschg. 61, 99 (1956).

LEESE, H.J., BRONK, J.R.: Automated Fluorometric Analysis of Micromolar Quantities of ATP, Glucose, and Lactic Acid. Analytic. Biochem. 45, 211 (1972).

DEL MONTE, U., ROSSI, C.B.: Glucose Supply by the Living Host and Glycolysis of Yoshida Ascites Hepatoma in Vivo. Cancer Res. 23, 363 (1963).

NAKAMURA, W., HOSODA, S.: The Absence of Glucose in Ehrlich Ascites Tumor Cells and Fluid. Biochim. Biophys. Acta 158, 212 (1968).

SHAPOT, V.S.: Some Biochemical Aspects of the Relationship between the Tumor and the Host. Advanc. Cancer Res. 15, 253 (1972).

WARBURG, O., HIEPLER, E.: Versuche mit Ascites-Tumorzellen. Z. Naturforschg. 7 b, 193 (1952).

WARBURG, O.: On the Origin of Cancer Cells. Science 123, 309 (1956).

WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A.-W.: Stoffwechsel von embryonalen Zellen und von Krebszellen. Z. Naturforschg. 11 b, 657 (1956).

WU, R.: Control Mechanisms of Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells. J. Biol. Chem. 240, 2827 (1965).

Lebenslauf

18.10.1948	geboren in Berlin
	Eltern: Herbert Hanke (Schriftsachverständiger) Johanna Hanke, geb. Symma (Lehrerin)
1955 - 1959	Besuch der 10. Grundschule in Berlin-Wittenau
1959 - 1968	Besuch der Salvator-Oberschule, eines neusprachlichen Gymnasiums in Berlin-Waidmannslust
12.02.1968	Reifeprüfung an der Salvator-Oberschule
SS 1968	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der FU Berlin
11.03.1969	naturwissenschaftliche Vorprüfung
31.08.1970	ärztliche Vorprüfung
21.03.1972	Heirat
26.02.1974	ärztliche Prüfung
April 1974 - Mai 1975	Medizinalassistententätigkeit an der chirurgischen und der internen Abteilung des Städt. Humboldt-Krkh. sowie an der geb.-gyn. Abt. des Rudolf-Virchow-Krkh.
seit 01.06.1975	Assistenzärztin auf der geb.-gyn. Abteilung des Dominikus-Krkh. in Berlin-Hermsdorf

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 312885 - 313898